



Polycaprolactan/ tragacanth nanoscaffold enriched with sililymarin as a protector of neural progenitor cells under oxidative stress conditions

Najafi R^a, Asadi A^{a*}, Zahri S^a, Abdolmaleki A^b

^a Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

^b Department of Biophysics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Najafi R, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Polycaprolactan/ tragacanth nanoscaffold enriched with sililymarin as a protector of neural progenitor cells under oxidative stress conditions. Journal of Cell and Tissue . 2023;14(1): 66.

<https://10.52547/JCT/14.1.66>

KEYWORDS

scaffold, silymarin, tissue engineering, tragacanth, electrospinning

ABSTRACT

Aim: Tissue engineering refers to methods that are based on the use of scaffolds, cells and biologically active molecules to produce tissues with specific functions. The purpose of tissue engineering is to build structures that can regenerate, maintain and improve damaged tissue or the whole organ. Today, by using tissue engineering methods, various natural and synthetic scaffolds have been designed that can be used for nerve grafts. The physical, chemical and biological properties of the scaffold must be similar to the extracellular matrix of the body in order to avoid adhesion, growth and support the differentiation of cells. An ideal neural scaffold should have biodegradability, biocompatibility and proper tensile strength. Recently, the use of polycaprolactan as a suitable biodegradable material has been evaluated in many fields of tissue engineering. Antioxidants are among the substances, which seem to be able to prevent neuronal death by reducing the amount of ROS. Flavonoids include many compounds that have various biological effects in the body. Silymarin (*Silybum marianum*) is a flavonoid that has many effects, including anti-cancer effects and antioxidant properties. Tragacanth is a known natural polymer that has excellent biological properties such as biodegradability, biocompatibility, antibacterial and wound healing ability. It is obtained from the stems and branches of the Asian species tragacanth. It has outstanding structural stability against heat and acidity. The aim of this study is to produce polycaprolactan/ tragacanth /silymarin nanoscaffolds and to investigate the viability of pc12 cells on the scaffold under oxidative stress. Considering that silymarin has antioxidant properties, the use of polycaprolactan/ tragacanth /silymarin nanoscaffolds can prevent neuropathy of nerve cells.

Material and Methods: Scaffolds used in this research were prepared using the electrophoretic method. For this purpose, an electrospinning machine was used, which is equipped with a rotary collector with a thickness of 70 mm and a width of 50 mm. In order to prepare a polycaprolactan/ tragacanth nanoscaffold and load silymarin on it, a 7%

* Corresponding author. Tel.: 04531505487; Fax: 04531505487

E-mail address: tayeberamezani@gmail.com

DOI: <https://10.52547/JCT/14.1.66>

Received: Jan. 14, 2023; Received in revised form: Feb. 13, 2023; Accepted: Feb. 19, 2023

Original Article

© Author



polycaprolactan solution (dissolved in acetic acid), 0.7% by weight tragacanth solution (dissolved in acetic acid) and 0.9% by weight silymarin solution were mixed by a magnetic stirrer for 20 minutes, and in order to make the solution uniform, sodium dodecyl sulfate (SDS) with a concentration 1 percent by weight of the solvent was added to the solution and the suspension was homogenized for 20 minutes with an ultrasonic device, then the scaffold was prepared by an electrospinning device. . The nanofibers were collected in a period of 6 hours, the sample collection speed was 1 ml per hour, and the nanofiber samples were collected by rotating at 250 rpm. The distance between the injection needle and the scaffold is 12 cm and this process is done at a voltage of 15 kV. The morphology of the scaffold was evaluated by scanning electron microscope (SEM) and the chemical structure of the scaffold was evaluated by FTIR spectroscopy. To investigate the antioxidant properties of the scaffold, glucose 80 mg/L and H₂O₂, 150 macro L were used.

Results: Examining the morphology and chemical structure of the scaffold showed the proper porosity of the polycaprolactan/ tragacanth scaffold and the successful loading of silymarin on the scaffold. Evaluation of the oxidant properties of the scaffold after 24 hours of PC12 cell culture on it showed the increase in cell viability on the scaffold and the appropriate antioxidant properties of the scaffold.

Conclusion: The results of this research showed that the enrichment of polycaprolactan/ tragacanth scaffold with silymarin increased the proliferation and survival of PC12 cells under oxidative stress. Therefore, this scaffold can be a suitable candidate for tissue engineering in oxidative stress.



نانو داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا غنی شده با سیلیمارین به عنوان محافظ سلول‌های پیش ساز عصبی در شرایط تنش اکسیداتیو

رضا نجفی^۱، اسداله اسدی^{۲*}، صابر زهری^۳، آرش عبدالملکی^۴

^۱دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۳استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۴استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: مهندسی بافت به روش‌هایی اطلاق می‌شود که مبتنی بر استفاده از داربست‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های فعال بیولوژیکی برای تولید بافت‌های دارای عملکرد مشخص است. هدف آن قابلیت بازسازی، نگهداری و بهبود بافت آسیب‌دیده یا کل اندام است. هدف از این مطالعه تولید نانو داربست پلی کاپرولاکتان /کتیرا/سیلیمارین و بررسی زنده مانگی سلول‌های PC12 بر روی داربست تحت تنش اکسیداتیو می‌باشد.</p> <p>مواد و روش‌ها: به منظور تهیه نانو داربست، محلول پلی کاپرولاکتان ۷ درصد (حل شده در استیک اسید)، محلول کتیرا ۰/۷ درصد وزنی (حل شده در استیک اسید) و محلول سیلیمارین با غلظت ۰/۹ درصد وزنی مخلوط شد، سپس توسط دستگاه الکترورسی داربست تهیه شد. مورفولوژی داربست توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و ساختار شیمیایی داربست توسط طیف سنجی FTIR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی خواص آنتی اکسیدانتی داربست از گلوکز ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و H_2O_2 ۱۵۰، میکرولیتر استفاده شد.</p> <p>نتایج: بررسی مورفولوژی و ساختار شیمیایی داربست، نشان دهنده تخلخل مناسب داربست پلی کاپرولاکتان /کتیرا و بارگذاری موفق سیلیمارین بر روی داربست بود. ارزیابی خواص اکسیدانتی داربست بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌های PC12 بر روی آن نشان دهنده افزایش زنده‌مانی سلول‌ها بر روی داربست و خواص آنتی اکسیدانتی مناسب داربست بود. نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که غنی سازی داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا با سیلیمارین باعث افزایش توان تکثیر و زنده مانگی سلول‌های PC12 تحت تنش اکسیداتیو شد. از این رو این داربست می‌تواند کاندیدی مناسب برای مهندسی بافت در شرایطی با تنش‌های اکسیداتیو بالا باشد.</p>	<p>داربست، سیلیمارین، مهندسی بافت، کتیرا، الکترورسی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰</p>

۱- مقدمه

نانوالیاف پلیمرهای زیست سازگار دارای برنامه‌های کاربردی در زیست پزشکی، شامل پانسمان زخم (۱)، دارو رسانی و داربست مهندسی بافت می‌باشد. خواص منحصر به فرد نانوالیاف، مانند نسبت سطح به حجم بالا (۲)، اندازه منافذ مناسب (۳)، تخلخل نفوذپذیری و سهولت ساخت، چنین موادی را به منظور درمان کاربردی ساخته است. الکتروریسی یکی از انعطاف پذیرترین و ساده‌ترین تکنیک‌هایی است که امکان تولید الیاف با قطرهای مختلف از ده‌ها نانومتر تا چند میکرومتر را دارد (۴و۵). سیلیمارین حاوی مخلوطی از فلاونولیگنان‌های فعال و فلاونوئیدها است. سیلیمارین در درمان طیف وسیعی از بیماری‌های از جمله بیماری‌های کبدی استفاده شده است. فلاونولیگنان‌ها و فلاونوئیدهای اصلی در سیلیمارین به‌عنوان ترکیباتی که دارای فعالیت‌های دارویی زیادی هستند شناخته شده‌اند (۶). از نظر بیوشیمیایی، سیلیمارین در برابر رادیکال‌های آزاد خواص آنتی‌اکسیدانتی دارد (۷). سیلیمارین عمدتاً از شش فلاونولیگنان، سیلیبین (سیلیبین A و B) و ایزوسیلیبین (ایزوسیلیبین A و B)، سیلی کریستین، ایزوسیلی کریستین، سیلیدیانین و سیلیمونین تشکیل شده است و سایر فلاونوئیدها مانند تاکسیفولین، کورستین، دی‌هیدروکمپفرول، کامپفرول، آپیژنین، نارینگین، اریودکتیول و کریزواریول نیز در ترکیب سیلیمارین وجود دارد. باقیمانده سیلیمارین (۲۰ تا ۳۰ درصد) از ترکیباتی تشکیل شده است که شامل ۷-۵ دی‌هیدروکسی کرومون، دهیدروکنیفریل الکل، (۶۰ درصد اسید لینولئیک، ۳۰ درصد اسید اولئیک، ۹ درصد اسید پالمیتیک)، توکوفرول، استرول‌ها (کلسترول، کامپسترول، استیگماسترول و سیتوسترول)، قندها (آرابینوز، رامنوز، زایلوز و گلوکز) و پروتئین‌ها است (۸و۹و۱۰). صمغ‌ها گروهی از پلی‌ساکاریدها هستند که به‌طور طبیعی می‌توانند توسط گیاهان (درختان و بوته‌ها، دانه‌ها و غده‌ها)، جلبک‌های قرمز و جلبک‌های دریایی قهوه‌ای یا منابع میکروبی تولید شوند (۱۱). صمغ کتیرا به‌صورت تراوش خشک شده از ساقه و شاخه‌های صمغ گون استخراج می‌شود و بسیار آب‌دوست، زیست سازگار، دارای ثبات ساختاری برجسته در برابر گرما، اسیدیته و پیری است. برای مصرف خوراکی بی‌خطر است. از نظر شیمیایی، از دو بخش تشکیل شده است: بخش محلول در آب و بخش بسیار منشعب (۳۰ تا ۴۰ درصد) به‌نام تراگاکانتین (شامل قندهایی مانند ال-آرابینوز، ال-فوکوز، دی-مانوز، دی-گلوکز، دی-گالاکتوز و d-گزیلوز) و بخش نامحلول اما قابل تورم در آب (۶۰ تا ۷۰) به‌نام تراگاکانتیک اسید یا باسورین (متشکل از ال-فروکتوز، دی-گزیلوز، دی-گالاکترونیك اسید، دی-گالاکتوز و ال-رامنوز) (۱۲). صمغ کتیرا به‌عنوان یک مولکول مفید مشتق شده از گیاه کاربردهای گسترده‌ای مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی، مانند لوسیبون‌های خارجی کرم‌های مو و دست دارد (۱۳ و ۱۴). صمغ کتیرا به‌دلیل پایداری قابل توجه در محدوده وسیعی از pH و دما، معمولاً به‌عنوان یک امولسی‌فایر در مواد غذایی، داروها و صنایع مرتبط با ماندگاری فوق‌العاده طولانی استفاده می‌شود (۱۵). بر این اساس، صمغ کتیرا به‌طور کلی به‌عنوان یک ماده ایمن توسط سازمان غذا و دارو شناخته شده است. همچنین تجزیه پذیری در سیستم‌های زنده صمغ کتیرا را به یک ماده بسیار جالب در مهندسی بافت و استراتژی‌های پزشکی بازساختی تبدیل می‌کند (۱۶). علاوه بر کاربردهای ترمیم بافت نرم، صمغ کتیرا در بازسازی بافت‌های سخت به تنهایی یا درون کامپوزیت‌ها استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، حائری و همکاران (۱۷) گزارش داد که صمغ کتیرا می‌تواند به‌عنوان یک بستر مناسب برای ترویج چسبندگی، تکثیر و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی باشد. سیلیمارین به‌دلیل خواص ضد التهابی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی خود به‌خوبی شناخته شده است، اما همچنین مجموعه‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی مثبت مانند تحریک سنتز پروتئین، محافظت از قلب، محافظت عصبی، نوروتروفیک و تعدیل سیستم ایمنی را اعمال می‌کند. سیلیمارین همچنین اثرات ضد سرطانی در رده‌های سلولی سرطان انسان، و به‌ویژه در متابولیسم کبد، بازسازی سلولی در آسیب سمی کبد اعمال می‌کند

(۱۸). همچنین در پژوهش دیگری نشان داده شده است سیلیمارین فعالیت ضد دیابتی را نشان می دهد و اثرات کاهش چربی خون و ضد فیبروتیک در بیماری التهابی مزمن کبدی نیز دارد (۱۹). مطالعه حاضر در نظر دارد اثر آنتی اکسیدانتهی داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا، غنی شده با سیلیمارین را بر میزان محافظت سلولی به دنبال ایجاد تنش اکسیداتیو توسط میزان بالای گلوکز و H_2O_2 را بر سلول های PC12 کشت شده روی داربست مورد بررسی قرار دهد.

۲- مواد و روش ها

طراحی مطالعه: مطالعه حاضر از نوع تجربی به صورت *in vitro* می باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی نانوزیست فناوری دانشگاه محقق اردبیلی و با کد اخلاقی (IR.UMA.REC.1401.022) و حمایت مالی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شده است.

تهیه نانو داربست: نانو داربست های مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش الکتروریسی تهیه شدند. برای این منظور از دستگاه الکتروریسی فناوران نانو ساخت ایران استفاده شد که این دستگاه مجهز به یک جمع کننده دوار با ضخامت 70mm و پهنای 50mm می باشد. به طور خلاصه به منظور تهیه نانو داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا و بارگذاری سیلیمارین بر روی آن، محلول پلی کاپرولاکتان ۷ درصد (حل شده در استیک اسید)، محلول کتیرا ۰/۷ درصد وزنی (حل شده در استیک اسید) و محلول سیلیمارین با غلظت ۰/۹ درصد وزنی مخلوط شد، و به منظور یکنواخت شدن محلول، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) با غلظت ۱ درصد وزنی نسبت به حلال به محلول اضافه شد سپس سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه با دستگاه اولتراسونیک هموزنایز گردید و برای ساخت نانو الیاف در دستگاه الکتروریسی قرار داده شد. نانوالیاف در بازه زمانی ۶ ساعت جمع آوری شدند که سرعت جمع آوری نمونه ها ۱ میلی لیتر در ساعت بود و فاصله سوزن تزریق تا داربست ۱۲ سانتی متر و در ولتاژ ۱۵ kV این فرآیند انجام شد.

بررسی مورفولوژی و فراساختار نانو داربست: برای بررسی خواص سطحی و اندازه گیری قطر نانو داربست از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. ابتدا نمونه ها با طلا پوشش دهی شده و تصویربرداری انجام شد.

بررسی ویژگی های شیمیایی نانو داربست ها: جهت تشخیص ساختار شیمیایی داربست تهیه شده، از طیف سنجی FTIR (اسپکترومتري مادون قرمز تبدیل فوریه) استفاده شد. بدین منظور طیف FTIR در محدوده طول موج 4000-400 CM-1 توسط دستگاه طیف سنج SHIMADZU ساخت کشور ژاپن تهیه شد.

بررسی تعداد و قطر منافذ داربست: تعداد و قطر منافذ داربست سطح داربست توسط image z مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان دهنده ی قطر مناسب منافذ داربست برای کشت سلول بود.

آماده سازی و استریل نمودن داربست پیش از کشت سلول: پیش از کشت سلول، داربست های تهیه شده به قطعات ۱ سانتی متر مربع بریده شده و در داخل چاهک های پلیت ۲۴ خانه قرار داده شدند. داربست های داخل چاهک دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه توسط بافر (نمک فسفات با خاصیت بافری) PBS حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین شستشو داده شدند. سپس داربست ها زیر هود به مدت ۲۰ دقیقه زیر اشعه UV قرار گرفتند.

کشت سلول: در این پژوهش سلول های (PC12) (از انیستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول های تهیه شده در محیط کشت RPMI (محصول شرکت Gibco، انگلستان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین اسب و ۵ درصد سرم جنین گاوی (محصول

شرکت Gibco ، انگلستان) و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (محصول شرکت Gibco ، انگلستان) کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند.

بررسی اتصال سلول های PC12 بر روی داربست: پس از استریل کردن داربست ها تعداد ۵۰۰۰۰ سلول PC12 بر روی هر یک از داربست ها در پلیت ۲۴ خانه در بازه کشت داده شد. سپس نمونه های داربست حاوی سلول فیکس شدند و پس از طی مراحل خشک کردن نمونه ها به منظور بررسی اتصال سلول ها به داربست توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تصویربرداری شدند.

قرار دادن سلول ها تحت تنش اکسیداتیو (گلوکز و H₂O₂): برای بررسی خواص آنتی اکسیدانتهی داربست، به دنبال کشت سلول ها و ۲۴ ساعت بعد از رشد، در بررسی اثرات آنتی اکسیدانتهی در مقابل تنش اکسیداتیو با گلوکز، به غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر گلوکز جهت ایجاد مرگ به محیط کشت شاهد و حاوی داربست اضافه شد و همچنین برای بررسی اثرات آنتی اکسیدانتهی در مقابل تنش اکسیداتیو با H₂O₂ ، ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول، ۱۵۰ میکرو لیتر H₂O₂ به محیط کشت اضافه شد و ۲۴ ساعت بعد سلول ها از نظر توان حیاتی و نقش آنتی اکسیدانتهی داربست مورد بررسی قرار گرفتند.

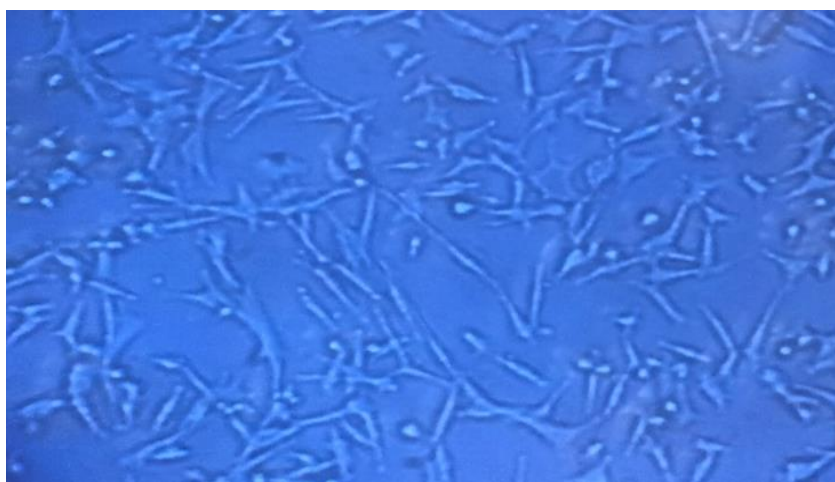
۳- آنالیز آماری

تمام آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و داده ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شدند. نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم شد. مقدار (p<0.05) از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

بررسی مورفولوژی سلول PC12

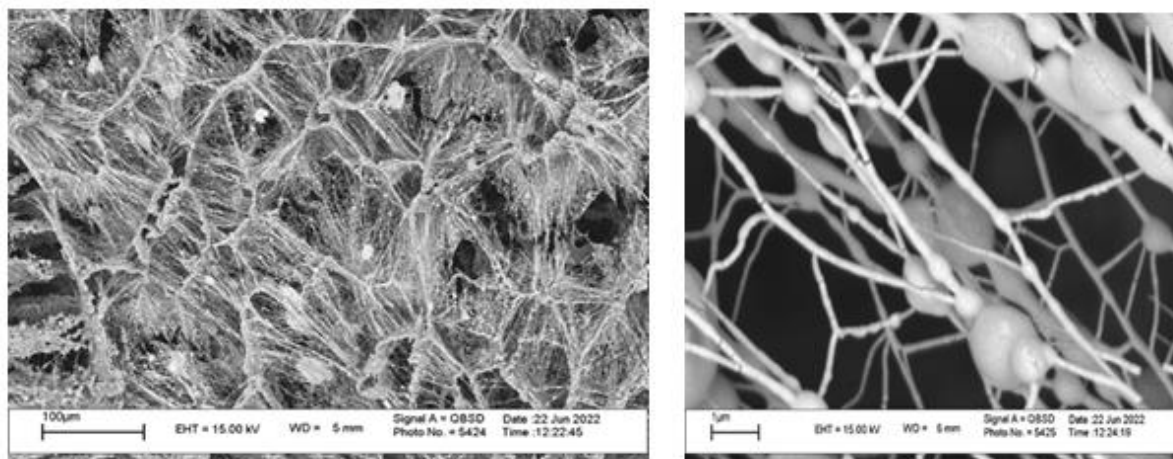
بررسی سلول های کشت شده توسط میکروسکوپ فاز معکوس نشان داد که سلول های کشت شده در محیط (Roswell Park Memorial Institute (RPMI رشد کافی داشته و از نظر مورفولوژی دوکی شکل بودند (شکل ۱).



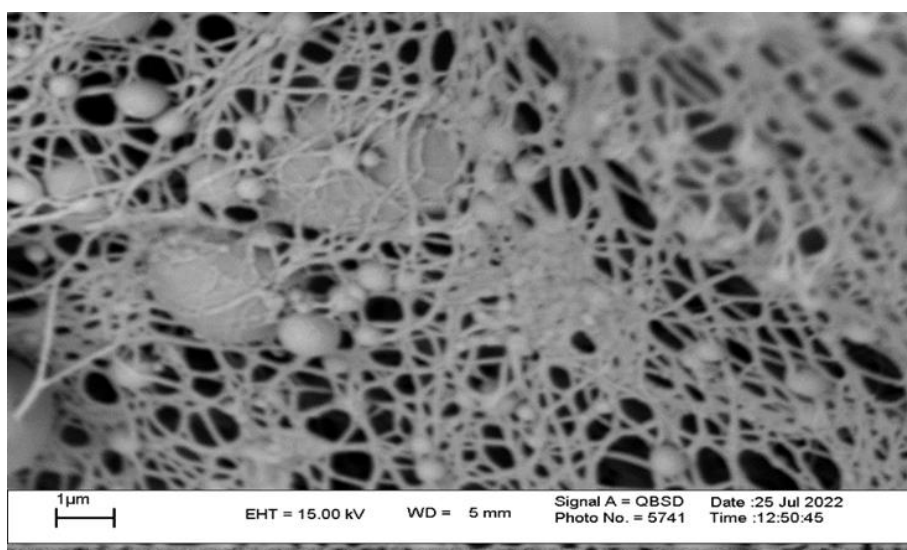
شکل ۱: سلول های PC12 کشت داده شده در محیط کشت RPMI. بزرگنمایی ۴۰۰×

بررسی مورفولوژی و فراساختار نانو داربست

نتایج حاصل از فراساختار داربست ها و بررسی قطر الیاف توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که داربست ها در مقیاس نانو تهیه شده اند، همچنین بررسی سطح داربست ها نشان دهنده تخلخل مناسب جهت رشد و اتصال سلول ها بر روی داربست می باشد (شکل ۳ و ۲).



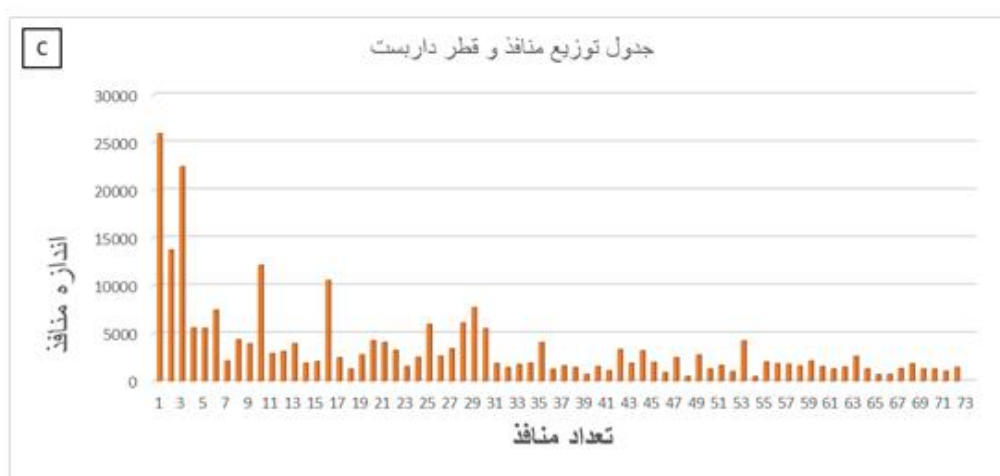
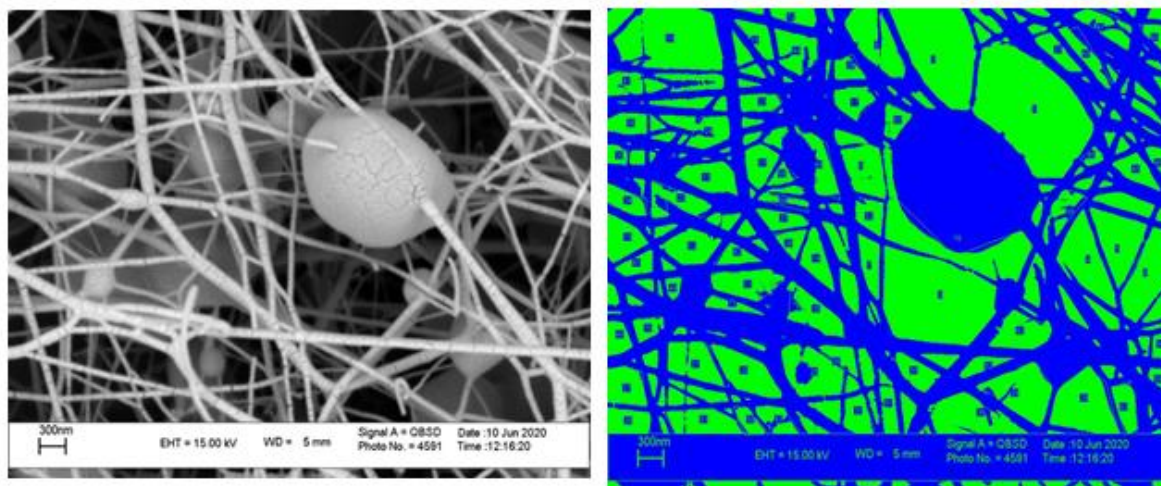
شکل ۲: تصاویر SEM از داربست الکترونیسی شده سیلیمارین/PCL/کتیرا قبل از کشت سلول ، همان طور که در شکل مشاهده می شود داربست دارای سطح صاف و تخلخل مناسب برای کشت سلول می باشد.



شکل ۳: میکرو گراف SEM از داربست سیلیمارین/پلی کاپرولاکتان بعد از کشت سلول

بررسی اندازه منافذ داربست ها

برای بررسی اندازه منافذ و تعداد منافذ داربست ها بر روی داربست پلی کاپرولاکتان /کتیرا/سیلیمارین از نرم افزار z image استفاده شد که نتایج نشان دهنده تخلخل مناسب داربست برای رشد و چسبندگی سلول بود (شکل ۴).



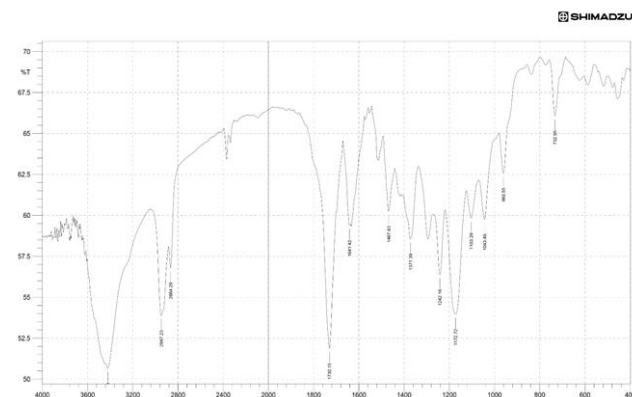
شکل ۴: تصویر چگونگی توزیع منافذ داربست سیلیمارین/ پلی کاپرولاکتون/کتیرا (A. تصویر SEM (B تصویر گرافیکی از موقعیت منافذ (C نمودار توزیع منافذ

بررسی ساختار شیمیایی نانو داربست‌ها توسط طیف سنجی FTIR

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است به‌طور کلی طیف جذبی پلی کاپرولاکتان دارای سه پیک شاخص در اعداد موج 1730 ، 2865 و 2947 cm^{-1} می‌باشد که به‌ترتیب نشان دهنده وجود ارتعاش کششی پیوندهای $\text{C}=\text{O}$ و ارتعاش پیوندهای CH_2 می‌باشد. و از پیک‌های شاخص سیلیمارین در اعداد طول موج 1242 ، 1103 ، 1043 ، cm^{-1} نشان دهنده ارتعاش پیوندهای $\text{C}-\text{O}$ ، 1731 نشان دهنده COOH کربوکسیلیک اسید، 1508 Cm^{-1} نشان دهنده $\text{C}=\text{C}$ آروماتیک و 3442 مربوط به کشش $\text{O}-\text{H}$ در ساختار سیلیمارین قابل تشخیص می‌باشد که نشان دهنده پوشش‌دهی مناسب نانو داربست پلی کاپرولاکتان با سیلیمارین می‌باشد (۱۹ و ۲۰).

نوارهای جذب اصلی موجود در طیف صمغ به‌ترتیب 3432 ، 2936 ، 2128 ، 1738 ، 1637 ، 1427 ، 1243 ، 1165 ، 1079 و 1039 ، 1 سانتی‌متر بودند. گسترده نوار مشاهده شده در 3432 Cm^{-1} را می‌توان به ارتعاشات کششی گروه‌های $\text{O}-\text{H}$ در کتیرا اختصاص داد. نوارها در 2936 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های متیلن نامتقارن و متقارن هستند. نوار پهن

در Cm-1 ۲۱۲۸ از گونه های مختلف کربونیل صمغ ناشی می شود. نوار ۱۷۳۸ را می توان به ارتعاشات کششی کربونیل در آلدئیدها، کتون ها و اسید کربوکسیلیک اختصاص داد. نوار قوی تر یافت شده در ۱۶۳۷ سانتی متر می تواند به کشش نامتقارن مشخصه گروه کربوکسیلات اختصاص داده شود. کشش متقارن گروه کربوکسیلات را می توان به باندهای موجود نسبت داد در ۱۴۲۷، ۱۰۳۹ و ۱۰۷۹ و ۱۱۶۵ و ۱۲۴۳ پیک. پیک Cm-1 به ترتیب به دلیل ارتعاشات کششی C-O پلی ال ها، اتر و گروه های الکلی بودند.



شکل ۵: طیف سنجی FTIR نانو داربست پلی کاپرولاکتون /سیلیمارین/کتیرا

زیست سازگاری نانو داربست

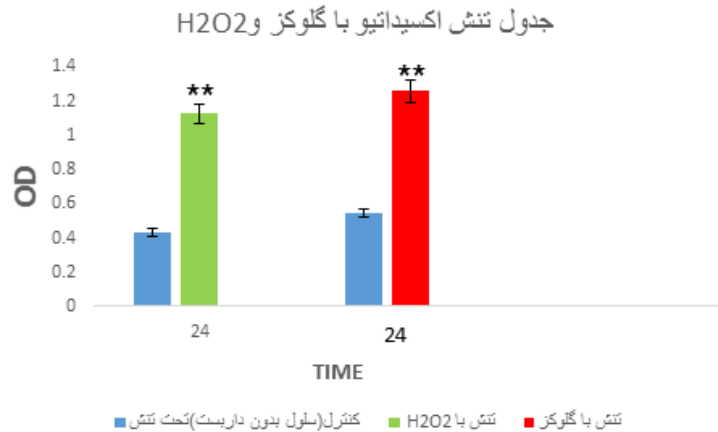
نتایج حاصل از رشد و تکثیر سلول ها بر روی نانو داربست در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت سلول ها نشان داد که زنده ماندن سلول ها در نانو داربست پلی کاپرو لاکتان/کتیرا حاوی سیلیمارین نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است. همچنین نانو داربست سمیتی بر روی سلول های کشت شده نداشت (نمودار ۱). همچنین بررسی اتصال و چسبندگی سلول ها بر روی داربست نشان داد که سلول ها به طور یکنواخت توزیع شده و به دلیل تخلخل مناسب به طور کامل به داربست متصل شده و بر روی آن گسترش یافته اند.



نمودار ۱: نتایج حاصل از تست MTT، میزان زنده ماندن سلولی داربست، پلی کاپرولاکتون/کتیرا/سیلیمارین و گروه کنترل بعد از ۴۸ ساعت در طول موج ۵۷۰ نانومتر می باشد. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نمایش داده شده است (۳ بار تکرار) مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شد.

بررسی آنتی‌اکسیدان‌تی داربست پلی‌کاپرولاکتان/کتیرا/سیلیمارین

برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدان‌تی داربست از گلوکز با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و H_2O_2 به مقدار ۱۵۰ میکرو لیتر استفاده شد. بعد از کشت سلول روی داربست، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت به صورت جداگانه تحت تنش اکسیدان‌تیو گلوکز و H_2O_2 قرار گرفت. نتایج حاصل از MTT نشان دهنده توان حیاتی بالا و معنادار داربست پلی‌کاپرولاکتان/کتیرا غنی شده با سیلیمارین تحت تنش اکسیدان‌تیو نسبت به گروه کنترل تحت تنش بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: نمودار حاصل از تست MTT میزان زنده ماندن سلولی داربست پلی‌کاپرولاکتان/کتیرا/سیلیمارین و گروه کنترل بدون داربست که تحت تنش اکسیدان‌تیو گلوکز و H_2O_2 قرار گرفت. مقدار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار در نظر گرفته شد.

۵- بحث

مهندسی بافت با هدف ترمیم بافت از طریق استفاده از ابزار بیولوژیکی مثل سلول‌ها و همچنین به کمک ابزارهای سنتتیک مؤثر، برای طراحی داربست می‌باشد. در بافت کامل یک جاندار، سلول‌ها در ریز محیط‌های سه بعدی قرار می‌گیرند و اطرافشان توسط ماتریکس خارج سلولی و سلول‌ها احاطه می‌شود (۲۱ و ۲۲). در این کار از روش الکترولیز برای انتخاب پلیمر پلی‌کاپرولاکتون به عنوان ماده داربست استفاده شد. این پلیمر که خطی و آبگریز است، به دلیل کیفیت فیزیکی برجسته، در دسترس بودن و زیست سازگاری، اغلب در مهندسی بافت استفاده می‌شود. همچنین تصور می‌شود که این ماده قابل استفاده برای استفاده در پزشکی است. سیلیمارین، یک فلاونوئید با فواید متعدد، از جمله تاثیر ضد سرطانی و قابلیت‌های آنتی‌اکسیدان‌تی، نیز به عنوان یک عامل بارگذاری مورد استفاده قرار گرفت. مهم‌ترین جزء سیلیمارین که عصاره‌ای است از ایزومرهای متعدد تشکیل شده و تقریباً ۸۰ درصد از این عصاره را تشکیل می‌دهد، سیلی بینین است (۲۳). کتیرا یک پلیمر طبیعی است و از آن جایی که برخی از پلیمرهای طبیعی در ساختار ماتریکس خارج سلولی یافت می‌شود، می‌توان از آن در مهندسی بافت استفاده کرد زیرا چسبندگی سلولی قوی دارد. کتیرا محیط مساعدی را برای رشد سلولی در بدن انسان ایجاد می‌کند در حالی که هیچ اثر حساس کننده، جهش زا، سرطان زا، نقص جنینی یا سمی روی آن ندارد. همچنین کتیرا در بهبود و بازسازی زخم بسیار موفق می‌باشد. اجزای فعال کتیرا (باسورین) به ساخت سریع کلاژن و بهبود زخم‌ها کمک می‌کند. کتیرا علاوه بر قابلیت تنظیم رهاسازی داروها در دارورسانی، دارای ویژگی‌های ضد باکتری و التیام دهنده است. علاوه بر این، خواص ضد

باکتریایی کتیرا آن را برای سیستم های ضد میکروبی و پانسمان زخم مفید می کند (۲۴). تصاویر حاصل از SEM نشان دهنده اتصال مناسب سلول ها بر روی داربست بود همچنین نتایج حاصل از MTT سلول ها بر روی داربست قبل و بعد از تنش اکسیداتیو نشان از توانایی بالای داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا/سیلیمارین در زنده مانی سلول ها تحت تنش اکسیداتیو بود. آسیب شناسی آمیلوئید بتا در هر دو سیستم *in vitro* و *in vivo* به خوبی گزارش شده است. در مدل موش تراریخته AD (بیماری آلزایمر)، الیگومریزاسیون آمیلوئید بتا ناشی از بیان بیش از حد APP (پیش ساز پروتئین آمیلوئید) به طور بالقوه توسط سیلیمارین مهار شد (۲۵). علاوه بر این، تجویز سیلیمارین در حیوانات نیز برای پاکسازی رسوبات فیبریلار آمیلوئید بتا گزارش شده است. در سیستم آزمایشگاهی، فیبریلیزاسیون و تجمع آمیلوئید بتا پس از انکوباسیون پپتیدهای آمیلوئید بتا با سیلیمارین به طور قابل توجهی کاهش یافت (۲۶). همچنین نشان داده شده است که سیلیمارین پتانسیل بازگرداندن استرس اکسیداتیو ناشی از آمیلوئید بتا وزنده ماندن سلولی را دارد. کاهش سمیت آمیلوئید بتا توسط سیلیمارین به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانتی آن گزارش شده است (۲۷). سیلیمارین با افزایش فعالیت نشانگرهای آنتی اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی، استرس اکسیداتیو و سمیت عصبی ناشی از استامینوفن و منگنز را در مدل های حیوانی خنثی می کند (۲۸ و ۲۹). سیلیمارین با کاهش اکسیداسیون لیپید و پروتئین، و همچنین با فعال کردن فعالیت استیل کولین استراز، و بیان ژن سنتاز نیتریک اکسید القایی، اثرات محافظت کننده عصبی خود را در سمیت عصبی ناشی از منگنز ایجاد می کند (۳۰). در هیپوکامپ و قشر مغز جوندگان مسن، سیلیمارین با مهار بالقوه تشکیل رادیکال های اکسیژن و پراکسیل همراه با محصولات اکسیداسیون پروتئین، محافظ عصبی در برابر آسیب های اکسیداتیو را اعمال می کند (۳۱). تجویز سیلیمارین در یک مدل حیوانی انسفالوپاتی تولید شده توسط اسید ۴ پنتوتئیک، فعالیت تنفسی در میتوکندری مغز را افزایش داد و پراکسیداسیون لیپیدی را مهار کرد (۳۲) به طور کلی، نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM و آزمون MTT نشان داد که داربست پلی کاپرولاکتان/سیلی-مارین بسیار سازگارتر از داربست پلی کاپرولاکتان/کتیرا است. به منظور اعمال مهندسی بافت عصبی در ترمیم آسیب های عصبی، به نظر می رسد داربست پلی کاپرولاکتان/سیلیمارین می تواند یک نامزد امیدوارکننده باشد (۳۳). نتایج به دست آمده نشان داد که داربست های الیاف PCL حاوی میکروسفرهای کلاژن / نانوذرات Bioglass 58S/3% و ۱۰ درصد (جرم-جرم) می توانند انتخاب مناسبی برای ترمیم عیوب استخوانی باشند. مطالعات بیشتری باید در آینده برای ارزیابی عملکرد *in vivo* داربست های الیاف PCL حاوی میکروسفرهای کلاژن / نانوذرات Bioglass 58S حاوی ۳ درصد وزنی و ۱۰ درصد وزنی برای بازسازی نقص های استخوانی انجام شود (۳۴). در مطالعه ای دیگر، داربست بسیار متخلخل از ژلاتین/کتیرا/نانو هیدروکسی آپاتیت با خواص مکانیکی مشابه استخوان اسفنجی از طریق خشک کردن انجمادی ساخته شد. داربست قابل تجزیه زیستی بود زیرا ۱۰ درصد وزن اولیه خود را پس از ۴ هفته خیساندن در PBS از دست داده است. داربست زیست فعال بود. داربست ژلاتین/کتیرا/نانو هیدروکسی آپاتیت حاوی کوئرستین به طور بالقوه باعث ایجاد استخوان و مناسب برای بازسازی استخوان است (۳۵). کامپوزیت های نانو این توانایی را دارند که دارورسانی بهتری داشته باشند و همچنین در هنگام استفاده در ساخت داربست به بهبود تکثیر سلولی کمک می کنند.

پلی ساکاریدهای صمغ، در صورت استفاده به عنوان کامپوزیت با سایر مواد زیستی پتانسیل بهبود خواص فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیکی داربست ساخته شده را دارند و می توان بر سمیت سلولی بیومواد مختلف با مخلوط کردن آن ها با پلی ساکاریدهای صمغ طبیعی غلبه کرد (۳۶).

۶- نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی SEM و همچنین تست MTT، زیست سازگاری بالای داربست پلی کاپرولاکتان/سیلیمارین/کتیرا و تخلخل مناسب داربست را نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین بررسی MTT داربست تحت تنش اکسیداتیو با گلوکز بالا و H_2O_2 نشان دهنده توان آنتی اکسیدانتی بالای داربست بر سلول‌های PC12 بود. بنابراین به نظر می‌رسد که داربست پلی کاپرولاکتان/سیلیمارین/کتیرا می‌تواند کاندیدای امیدوارکننده‌ای برای کاربرد در مهندسی بافت عصبی باشد.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه محقق اردبیلی به دلیل حمایت مالی و فراهم آوردن تجهیزات اعلام می‌دارند.

۹- منابع

1. Neamark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, et al. In vitro biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. *Eur Polym.* 2008; 44(7): 2060–2067.
2. Abdelhady S, Honsy K, Kurakula M, et al. Electro spun- nanofibrous mats: a modern wound dressing matrix with a potential of drug delivery and therapeutics. *J Eng Fibers Fabrics.* 2015; 10(4): 179–193.
3. Gouda M, Hebeish A, Aljafari AL, et al. Synthesis and characterization of novel drug delivery system based on cellulose acetate electrospun nanofiber mats. *J Ind Textile.* 2014;43(3):319_329
4. Nawalakhe RG, Hudson SM, Mohamed Seyam AF, et al. Development of electrospun iminochitosan for improved wound healing application. *J Eng Fibers Fabrics.* 2012; 7(2): 47–55.
5. Han X, Xing Z, Si S, et al. Electrospun grape seed polyphenols/gelatin composite fibers contained silver nanoparticles as biomaterials. *Fibers Polym.* 2014; 15(12): 2572–2580
6. Chambers C.S, Holečková V, Petrásková L, Biedermann D, et al. The silymarin composition... and why does it matter? *Food Res Int.* 2017;100: 339-353
7. SURAI, Peter F. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants.* 2015; 4(1): 204-247.
8. BIJAK M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules.* 2017; 22(11): 1942_1958.
9. KREN V, et al. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed papers,* 2005; 149(1): 29-41.
10. Wellington K, Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *BioDrugs,* 2001; 15: 465-489.
11. Nussinovitch A. Plant gum exudates of the world: sources, distribution, properties, and applications. CRC Press; 2009; 12: 21_40
12. Carpentier J, Conforto E, Chaigneau C, Vendeville JE, et al. Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum: Comparative study with commercial polysaccharides. *Innovative Food Sci Emerging Technol.* 2021;5(1):1026_1041.

13. Zarshenas M, Arabzadeh A, Tafti M.A, Kordafshari G, et al. Application of herbal exudates in traditional Persian medicine. *Galen Med. J.* 2013;1:78–83.
14. Whistler, R.L. Exudate gums. In *Industrial Gums*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1993; 5: 309–339.
15. Mohamadnia Z, Zohuriaan-Mehr M.J, Kabiri K, Razavi-Nouri M. Tragacanth gum-graft-polyacrylonitrile: Synthesis, characterization and hydrolysis. *J. Polym. Res.* 2008;15:173–180
16. Kaith B.S, Jindal R, Kumar V. Biodegradation of Gum tragacanth acrylic acid based hydrogel and its impact on soil fertility. *Polym Degrad Stab.* 2015;115:24–31.
17. Haeri S.M.J, Sadeghi Y, Salehi M, Farahani R.M, et al. Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on gum tragacanth hydrogel. *Biologicals* 2016; 44:123–128.
18. Kulanthaivel S, Sharan Rathnam V.S, Agarwal T, Pradhan S, et al. Gum tragacanth–alginate beads as proangiogenic–osteogenic cell encapsulation systems for bone tissue engineering. *J Mater Chem B.* 2017; 5:4177–4189.
19. Javed S, Kohli K, Ali M. Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative medicine review*, 2011; 16(3): 239_250.
20. Gillessen A, Schmidt H. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: A narrative review. *Advances in therapy.* 2020; 37(4): 1279-1301.
21. He L, Liao S, Quan D, Ma K, et al. Synergistic effects of electrospun PLLA fiber dimension and pattern on neonatal mouse cerebellum C17. 2 stem cells. *Acta Biomater.* 2010;6(8):2960-2969.
22. Abbaszadeh S, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A, et al. Does Phenytoin Have Neuroprotective Role and Affect Biocompatibility of Decellularized Sciatic Nerve Scaffold? *Gene Cell Tissue.* 2021;8(1):1087_1097.
23. Sharifi F, Irani S, Zandi M. Synthesis and surface modification of polycaprolactone nanofibers for tissue engineering. *J Ardabil university of medical sci.* 2014;14(3):217-228.
24. Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Biosynthesis, characterization and evaluation of the supportive properties and biocompatibility of DBM nanoparticles on a tissue-engineered nerve conduit from decellularized sciatic nerve. *Regenerative Therapy.* 2020;14: 315-321.
25. Murata N, Murakami K, Ozawa Y. Silymarin attenuated the amyloid- β plaque burden and improved behavioral abnormalities in an Alzheimer's disease mouse model. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74: 2299–2306.
26. Yin F, Liu J, Ji X, Wang Y, et al. Silibinin: A novel inhibitor of A β aggregation. *Neurochem Int.* 2011;58: 399–403.
27. Lu P, Mamiya T, Lu LL. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1270–1277.
28. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of Silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine.* 2007;14:129–135.
29. Chtourou Y, Fetoui H, Garoui el M, Boudawara T, et al. Improvement of cerebellum redox states and cholinergic functions contribute to the beneficial effects of Silymarin against manganese-induced neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2012;37:469–479.
30. Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. *Biometals.* 2010;23:985–996.
31. Galhardi F, Mesquita K, Monserrat JM, Barros DM. Effect of Silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:2655–2660.
32. Vengerovskii AI, Khazanov VA, Eskina KA, Vasilyev KY. Effects of Silymarin (hepatoprotector) and

- succinic acid (bioenergy regulator) on metabolic disorders in experimental diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med.* 2007;144:53– 56.
33. Najafi R, Asadi A, Zahri S, Abdolmaleki A. Comparison of Biocompatibility and Morphology of PC12 Cell Line on a Polycaprolactane/Silymarin Scaffold and a Polycaprolactane/Tragacanth Scaffold. *Gene, Cell and Tissue J.* 2022;1(25):1–10
34. Sahrapeyma H, Asefnejad A, Azami M, Sadroddiny E. Structural and morphological investigation of polycaprolactone multi-component scaffold containing collagen microsphere/bioglass nanoparticles. *Nanomed Res J.* 2022;7(4):338-349.
35. Madani P, Hesaraki S, Saedifar M, Ahmadi Nasab N. The controlled release, bioactivity and osteogenic gene expression of Quercetin-loaded gelatin/tragacanth/nano-hydroxyapatite bone tissue engineering scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2023; 34(2):217-242.
36. Koyyada A, Orsu P. Natural gum polysaccharides as efficient tissue engineering and drug delivery biopolymers. *J Drug Delivery Sci Technol.* 2021;63:1024-31.